

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 2 月 2 5 日

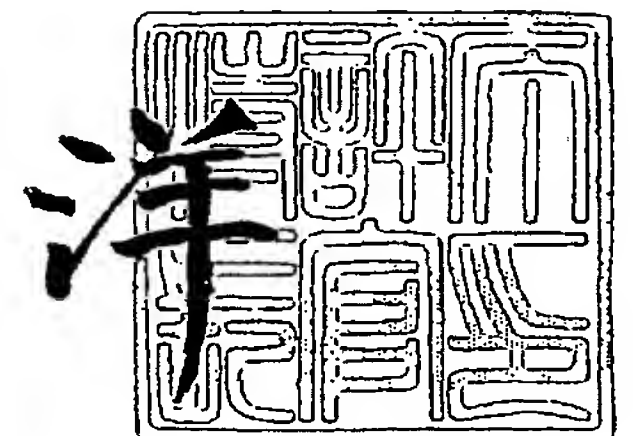
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 4 2 9 2 4 3  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 4 2 9 2 4 3 ]

出 願 人  
Applicant(s): カルピス株式会社

2 0 0 5 年 1 月 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-590  
【提出日】 平成15年12月25日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0 カルピス株式会社基礎  
    研究フロンティアラボラトリー内  
    【氏名】 吉村 千秋  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0 カルピス株式会社基礎  
    研究フロンティアラボラトリー内  
    【氏名】 増山 明弘  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000104353  
    【氏名又は名称】 カルピス株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100081514  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 酒井 一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100082692  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 蔵合 正博  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 007010  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0014648

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

ラクトバチルス・ヘルペティカス発酵乳ホエーを含む美肌促進剤。

【請求項 2】

前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカス CM4 株 (特許生物寄託センター 寄託番号 FERM BP-6060) である、請求項 1 記載の美肌促進剤。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 の美肌促進剤を含む化粧料組成物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 美肌促進剤及び化粧料組成物

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、皮膚の保湿及び美白等の作用を有する美肌促進剤に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

化粧料に特定の生理活性物質を美肌促進剤として添加すること、及び栄養補助食品等としてヒトが摂取しうる物質に特定の生理活性物質を美肌促進剤として添加することは、従来より行なわれている。また、そのような美肌促進剤として、乳酸菌発酵物を用いることも従来より提案されている(例えば特許文献1参照)。しかしながら、より高い美肌効果を有し商業的価値の高い新たな美肌促進剤を見出すべく、さらなる探索が行なわれている。

【0 0 0 3】

美肌を促進する作用のうちの重要なものの一つとして、皮膚組織の水分保持を促進する保湿作用が挙げられる。保湿作用の発現の機序としては、1)特定のアミノ酸から主に構成されるいわゆる天然保湿因子の増加による角層の水分保持、及び2)角層の水分を保持するバリアとして機能する細胞間脂質の増加による角質細胞の水分の保持及び天然保湿因子の流出防止等がある。天然保湿因子の主体をなすアミノ酸は、表皮ケラチノサイトが産生するフィラグリンというタンパク質の分解により供給されるため、フィラグリン産生促進能が保湿作用発現において重要な役割を果たすことになる。また、細胞間脂質は多種の脂質を含み多数の酵素反応により表皮において生成されるが、その中でもセラミドの生成が重要であり、その生成においてはセリンパルミトイルトランスフェラーゼによるスフィンゴシン骨格の形成が重要な役割を果たす。

【0 0 0 4】

美肌を促進するもう一つの重要な作用として、皮膚組織における色素の産生を抑制する美白作用が挙げられる。美白作用は、表皮メラノサイトにおけるメラニンの過剰生成の抑制によって主に達成される。

【0 0 0 5】

さらに、美肌促進剤には、上記のような美肌を促進する生理活性を有することのみならず、皮膚に対する傷害を発生させないことも求められる。

【特許文献1】 特開平4-356409号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

本発明の目的は、美肌促進効果が高く且つ皮膚に対する傷害が少ない美肌促進剤及び化粧料組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 7】

本発明によれば、ラクトバチルス・ヘルペティカス発酵乳ホエーを含む美肌促進剤が提供される。

また、本発明によれば、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株(特許生物寄託センター 寄託番号FERM BP-6060)である前記美肌促進剤が提供される。

さらに、本発明によれば、前記美肌促進剤を含む化粧料組成物が提供される。

【発明の効果】

【0 0 0 8】

本発明の美肌促進剤は、皮膚細胞に傷害を与える量より非常に少ない量で、優れた保湿作用及び美白作用を発現するため、美肌促進効果を有する化粧料の構成成分として有用である。本発明の化粧料組成物は、本発明の美肌促進剤を含むため、美肌促進効果を有する化粧料として有用である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

本発明の美肌促進剤は、ラクトバチルス・ヘルペティカス発酵乳ホエーを含む。前記ラクトバチルス・ヘルペティカスの菌株としては、菌体外プロテイナーゼ活性の高いものが好ましい。具体的には例えば、Twiningらの方法(Twining, S. Anal. Biochem. 143 3410(1984))をもとにしたYamamotoらの方法(Yamamoto, N.ら J. Biochem. (1993) 114, 740)にしたがって測定したU/OD<sub>590</sub>の値が400以上のものであることが好ましい。また、下記の菌学的性質を有するものを用いることができる：

## 【0010】

菌学的性質：

## 1. 形態学的性質

- 1) 細胞の形状；桿菌
- 2) 運動性；なし
- 3) 胞子の有無；なし
- 4) グラム染色性；陽性

## 【0011】

## 2. 生理学的性質

- 1) カタラーゼ；陰性
- 2) インドール生成；陰性
- 3) 硝酸塩の還元；陰性
- 4) 酸素に対する態度；通性嫌気性菌
- 5) グルコースによりホモ乳酸発酵によりDL (－) 乳酸を生成し、ガスの産生はない。
- 6) 各種炭水化物の分解性

グルコース；＋

ラクトース；＋

マンノース；＋

フラクトース；＋

ガラクトース；＋

シュークロース；－

マルトース；＋

キシロース；－

ラムノース；－

セルビオース；－

トレハロース；－

メルビオース；－

ラフィノース；－

スタキオース；－

マンニトール；－

ソルビトール；－

エスクリン；－

サリシン；－

## 【0012】

前記ラクトバチルス・ヘルペティカスとしては、ラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株(独立行政法人産業技術総合技術研究所特許生物寄託センター 日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6 寄託番号FERM BP-6060 寄託日1997年8月15日)が特に好ましい。

## 【0013】

前記発酵乳ホエーの調製方法は、特に限定されないが、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスを含む発酵乳スターターを乳に添加し、適切な発酵温度に維持することにより発酵乳を得、それからホエーを分離することにより製造することができる。

## 【0014】

前記乳としては、牛乳、馬乳、羊乳、山羊乳等の動物乳、及び豆乳等の植物乳を用いることができ、牛乳及び豆乳が好ましく、牛乳が特に好ましい。

#### 【0015】

前記発酵乳を調製する際の発酵温度及び発酵時間は、それぞれ好ましくは25～45℃及び3～72時間とすることができる。

#### 【0016】

前記発酵乳からのホエーの分離は、遠心分離、晒し布によるろ過等により行なうことができる。

#### 【0017】

前記方法等により得られた発酵乳ホエーは、そのまま、若しくは投与に適したものとするための他の物質と配合することにより、本発明の美肌促進剤とすることができる。

#### 【0018】

本発明の美肌促進剤は、外用剤として皮膚に直接適用することもでき、経口等の経路により投与することができる。本発明の美肌促進剤の投与量は、経口投与の場合、1日あたり発酵乳ホエーとして1～1000mL、好ましくは10～200mL/人とすることができる。

また外用剤として皮膚に直接適用する場合は、本発明の美肌促進剤を、発酵乳ホエーとして0.01～100質量%、好ましくは0.1～20質量%含むものを適量塗布することにより適用することができる。

また、本発明の美肌促進剤を、化粧水、乳液、スキนครリーム、パック剤等とするための他の物質と配合することにより、本発明の化粧料組成物とすることができる。

#### 【0019】

本発明の化粧料組成物において、前記本発明の美肌促進剤以外に配合しうる材料としては、特に限定されず公知の化粧料組成物の成分を用いることができる。具体的には例えば、非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤等の乳化剤；植物油、動物油、高級脂肪酸、高級アルコール、合成エステル油、ワックス類、シリコン油等の油性物質；水、香料、防腐剤、顔料、皮膚栄養剤、皮膚賦活剤、保湿剤、紫外線防止剤、pH調整剤、増粘剤等を挙げることができる。さらに、既存の医薬品及び医薬部外品に美白、抗炎症作用を発現させるための有効成分として配合される各種の物質をも、本発明の化粧料組成物に配合することができる。例えば、ビタミンC誘導体、アルブチン、グリチルリチン酸誘導体等を配合することができる。

#### 【0020】

本発明の化粧料組成物における前記美肌促進剤の配合割合は、特に限定されず、発酵乳ホエーとして0.01～100質量%、好ましくは0.1～20質量%とすることができる。

#### 【実施例】

#### 【0021】

以下、実施例を参照して本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 【0022】

#### 実施例 1

(発酵乳ホエーの調製)

9%脱脂粉乳からなる乳培地に乳酸菌(ラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株)スターター(菌数 $5 \times 10^8$ 個/mL)を3%接種して、37℃で24時間発酵させて発酵乳を得た。この発酵乳を遠心分離し、沈殿を除去し、発酵乳ホエーを得た。

#### 【0023】

#### 実施例 2

(SPT合成促進能の評価)

(1)表皮細胞(正常ヒトケラチノサイト、クラボウ製)を、HuMedia-KG2(商品名、クラボウ製)を培地として培養し、試験に供した。この表皮細胞を、 $5 \times 10^5$  cells/ディッシュの細胞密度で35mm培養ディッシュに播種し、同培地で24時間培養した後、培地を、実施例1で得た発酵乳ホエーを表1に示す各種濃度で含む同培地に交換し、さらに24時間培養した



。

## 【0024】

(2)培養終了後、細胞をPBS(-)にて洗浄し、500 $\mu$ L/ディッシュのTRIzol reagent(商品名、Gibco BRL社製)を用いて細胞を破碎した。100 $\mu$ L/ディッシュのクロロホルムを添加して、十分に混和した後、遠心操作によって上清の水層を得、2-プロパノールによりRNAを沈殿させ、全RNAを得た。この全RNAを冷75%エタノールで洗浄した後、DEPC水に溶解した。

## 【0025】

(3)上記DEPC水に溶解したRNA1 $\mu$ gについて、One step RT-PCRキット(商品名、Qiagen社製)を用い、そのプロトコル及び表3に示すプライマー及び反応条件に従い、RT-PCRを実施し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT) mRNA又はシクロフィリンmRNAに対応するcDNAの逆転写及び増幅を行なった。

## 【0026】

(4)反応後、反応産物を1%アガロースを用いて電気泳動して分離した。泳動ゲルをエチジウムブロミドにて染色し、トランスイルミネーターに乗せ紫外線照射下写真撮影し、撮影されたバンドの輝度を測定した。

## 【0027】

(5)SPT mRNAに由来するバンドの輝度を、どの細胞においても同量が発現すると考えられるシクロフィリンmRNAに由来するバンドの輝度で割ることにより規格化し、さらにその値を、(1)において培地中の発酵乳ホエー濃度を0%としたもの(対照)を100とした相対値で表した。試験は2回行なった。それぞれの結果を表1に示す。

## 【0028】

(6)別途、倍々希釈した各種の濃度の発酵乳ホエーを含むHuMedia-KG2培地において表皮細胞を培養し、培地中の発酵乳ホエーの、細胞毒性を示さない最高濃度を調べたところ、最高濃度は1.25%であった。

## 【0029】

比較例 1

(1)及び(6)において発酵乳ホエーの代わりに乳酸水溶液(2.67w/w%)を用いた他は、実施例2と同様に操作し、SPT mRNAの発現に対するその影響を調べた。結果を表1に示す。この乳酸水溶液の、細胞毒性を示さない最高濃度は1.25%であった。

## 【0030】

実施例 3 及び 比較例 2

SPT mRNAに対応するプライマーの代わりに、表3に示すフィラグリンmRNAに対応するプライマーを用い、PCRの条件を表3に示す通りとした他は実施例2及び比較例1と同様に操作し、フィラグリンmRNAの発現に対する発酵乳ホエー及び乳酸水溶液の影響を調べた。結果を表2に示す。

## 【0031】

## 【表1】

正常ヒト表皮細胞のSPTのmRNA発現に対する、  
発酵乳及び乳酸水溶液の作用

	濃度(v/v%)	試験結果	
		1回目	2回目
対照	0	100	100
比較例1 (乳酸水溶液)	0.63	91	111
	1.25	84	129
実施例2 (発酵乳ホエー)	0.63	153	171
	1.25	156	154

## 【0032】

【表 2】

正常ヒト表皮細胞のフィラグリンのmRNA発現に対する、発酵乳及び乳酸水溶液の作用

	濃度 (v/v%)	試験結果	
		1回目	2回目
対照	0	100	100
比較例1 (乳酸水溶液)	0.63	91	111
	1.25	84	129
実施例2 (発酵乳ホエー)	0.63	153	171
	1.25	156	154

【0033】

【表 3】

RT-PCRのプライマーと反応条件

遺伝子	配列	PCR条件	
		Tm(°C)	サイクル
SPT (実施例2)	センス	58	30
	アンチセンス		
フィラグリン (実施例3)	センス	56	30
	アンチセンス		
シクロフィリン (比較例1, 2)	センス	58	30
	アンチセンス		

【0034】

実施例 4

(メラニン産生抑制能の評価)

(1) B16F0マウスメラノーマ細胞(大日本製薬株式会社製)を、5%子牛血清(FBS)を添加したDMEM培地中で培養し、試験に供した。このメラノーマ細胞を、 $2 \times 10^4$  cells/ディッシュの細胞密度で35mm培養ディッシュに播種し、同培地で24時間培養した後、培地を、実施例1で得た発酵乳ホエーを表4に示す濃度で含む同培地に交換し、さらに6日間培養した。

【0035】

(2) 培養終了後、細胞にトリプシンを作用させることによりディッシュから剥離し、エッペンドルフチューブ中に入れ遠心し、細胞ペレットを作成した。このペレットの色を、目視にて、スコア1(白)から5(黒)までの5段階で評価した。結果を表4に示す。

【0036】

(3) さらに、発酵乳ホエーが細胞の増殖を阻害しないかどうかの目安とするため、ディッシュごとの総タンパク質量を、ローリー法によって測定した。結果を表4に示す。

【0037】

(4) ネガティブコントロールとして、(1)において培地中の発酵乳ホエー濃度を0%としたもの、及びポジティブコントロールとして培地に発酵乳ホエーを添加する代わりに50mM乳酸ナトリウムを添加したものについても、同様に試験した。結果を表4に示す。

【0038】

比較例 3

(1) 及び(3)において発酵乳ホエーの代わりに乳酸水溶液(2.67w/w%)を用いた他は、実施例4と同様に操作し、メラニン産生に対するその影響を調べた。結果を表4に示す。この乳酸水溶液の、細胞毒性を示さない最高濃度は1.250%であった。

【0039】



【表 4】

	濃度 (v/v%)	タンパク質量 ( $\mu$ g/ディッシュ)	色 (スコア)
無添加	-	374.54	4
50mM乳酸Na	-	432.67	2
乳酸水溶液 (比較例3)	0.313	441.55	4
	0.625	436.33	4
	1.250	422.06	3
発酵乳ホエー (実施例4)	2.500	339.93	1
	5.000	408.56	1
	10.000	221.99	1

## 【0 0 4 0】

## 処方例1及び2

下記表5及び6に示す成分を配合し、化粧水原料A及びBを得た。これらを50℃で加温溶解し、BをAに攪拌しながら徐々に加え可溶化した。攪拌しながら冷却し、30℃にて攪拌を止め、放置し、化粧水を製造した。製造したそれぞれの化粧水を被検者に皮膚に塗布したところ、良好な保湿及び美白の効果が得られた。

## 【0 0 4 1】

【表 5】

## 処方例1

	成分名	配合割合(質量比)
原料 A	グリチルリチン酸ジカリウム	0.2
	クエン酸	0.1
	クエン酸ナトリウム	0.3
	発酵乳ホエー(実施例1)	5.8
	精製水で全量	100.0
原料 B	テトラオレイン酸POE(60)ソルビトール <sup>1)</sup>	0.9
	モノオレイン酸ソルビタン <sup>2)</sup>	0.1
	ジプロピレングリコール	5.0
	エタノール	10.0

1) 市販品、商品名NIKKOL G0-460、日光ケミカルズ株式会社製

2) 市販品、商品名NIKKOL S0-10、日光ケミカルズ株式会社製

## 【0 0 4 2】

【表 6】

## 処方例2

	成分名	配合割合(質量比)
原料 A	クエン酸ナトリウム	0.1
	ピロリドンカルボン酸ナトリウム	1.0
	1,3-ブチレングリコール	5.0
	発酵乳ホエー(実施例1)	5.6
	精製水で全量	100.0
原料 B	POE(30)POP(6)デシルテトラデシルエーテル <sup>3)</sup>	0.9
	防腐剤	適量
	エタノール	10.0

3) 市販品、商品名NIKKOL PEN-4630、日光ケミカルズ株式会社製

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 美肌促進効果が高く且つ皮膚に対する傷害が少ない美肌促進剤及び化粧品組成物を提供する。

【解決手段】 ラクトバチルス・ヘルペティカス発酵乳ホエーを含む美肌促進剤、特に前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株(特許生物寄託センター 寄託番号FERM BP-6060)である前記美肌促進剤、並びに前記美肌促進剤を含む化粧品組成物。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 2 9 2 4 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 0 4 3 5 3 ]

1. 変更年月日 1 9 9 7 年 9 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都渋谷区恵比寿西 2 丁目 2 0 番 3 号  
氏 名 カルピス株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 8 月 2 5 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都渋谷区恵比寿南二丁目 4 番 1 号  
氏 名 カルピス株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019330

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-429243  
Filing date: 25 December 2003 (25.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse